



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 198 02 569 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 12 N 9/10**  
A 61 K 38/45  
// (C12N 9/10, C12R  
1:145)

⑲ Aktenzeichen: 198 02 569.6  
⑳ Anmeldetag: 23. 1. 98  
㉑ Offenlegungstag: 9. 9. 99

**DE 198 02 569 A 1**

⑦① Anmelder:  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 79098  
Freiburg, DE  
  
⑦④ Vertreter:  
Lederer, Keller & Riederer, 80538 München

⑦② Erfinder:  
Aktories, Klaus, Prof. Dr.Dr., 79189 Bad Krozingen,  
DE; Hofmann, Fred, Dr., 79110 Freiburg, DE  
  
⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
Datenbank Swisspat AC J 40884,  
Gene, 161 (1995), S. 57-61;  
EMBL-Genbank AC X82638;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤④ Toxikologisch aktive Fragmente des lethalen Toxins von *Clostridium sordellii* und deren Verwendung in Immuntoxinen
- ⑤⑦ Offenbart werden biologisch aktive Fragmente des lethalen Toxins von *Clostridium* und Immuntoxine, die diese Fragmente und eine Zellbindungskomponente aufweisen.

**DE 198 02 569 A 1**

## Beschreibung

Bei den verschiedensten Therapieansätzen werden unterschiedliche Toxine eingesetzt. Bei den Toxinen handelt es sich um Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen oder Pflanzen, die eine Giftwirkung auf den Organismus von Säugetieren und insbesondere des Menschen haben. Von bestimmten lebenden Bakterien werden die sogenannten Exotoxine, wie beispielsweise Cholera-, Diphtherie-, Tetanus-, Botulinus- oder Gasbrandtoxin abgesondert.

Die für die Therapie einsetzbaren Exotoxine wirken innerhalb der Zelle. Üblicherweise binden die Toxine zunächst an Rezeptoren an der Zelloberfläche, werden dann durch Endozytose aufgenommen und durchqueren eine intrazelluläre Membran, um das Zytosol in der Zelle zu erreichen. Im Zytosol rufen die Toxine dann die zytotoxischen Effekte hervor. Häufig stören die Toxine in dem Zytosol essentielle Stoffwechselwege. Die Störung tritt häufig bei der Proteinsynthese auf. Wenn Stoffwechselwege betroffen sind, die in jeder Zelle ablaufen, muß gewährleistet sein, daß bei der therapeutischen Anwendung das Toxin möglichst nur in die gewünschte Zielzelle gelangt, da anderenfalls die unerwünschten Nebenreaktionen überhand nehmen würden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Fragment eines bakteriellen Exotoxins, nämlich des sogenannten lethalen Toxins (LT), das von *Clostridium sordellii* gebildet wird. Das lethale Toxin von *Clostridium sordellii* gehört zu der Familie der großen Clostridienzytotoxine, die morphologische Veränderungen in Zelllinien hervorrufen. Diese gehen einher mit einer Zerstörung des Aktinzytoskeletts.

Das lethale Toxin ist eine Glucosyltransferase, die UDP-Glucose als Co-Substrat zur Modifikation von GTPasen mit niedrigem Molekulargewicht verwendet. LT modifiziert selektiv Rac und Rap sowie Ras. Ras ist der Prototyp einer Unterfamilie der Superfamilie der GTPasen mit niedrigem Molekulargewicht. LT modifiziert und inaktiviert Ras durch Glycosylierung eines essentiellen Threoninrestes (35). Durch die Glycosylierung wird Ras inaktiviert, was zu einer Inhibition des EGF (Epidermal Growth Factor) stimulierten MAP-Kinaseweges führt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein biologisch aktives Fragment des lethalen Toxins von *Clostridium*, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es die Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 oder eine hierzu homologe Sequenz aufweist, wobei die Homologie zu der Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 wenigstens 80% beträgt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist das biologisch aktive Fragment des lethalen Toxins die Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 auf.

M	N	L	V	N	K	A	Q	L	Q	K	M	V	Y	V	K		
F	R	I	Q	E	D	E	Y	V	A	I	L	N	A	L	E	5	
E	Y	H	N	M	S	E	S	S	V	V	E	K	Y	L	K		
L	K	D	I	N	N	L	T	D	N	Y	L	N	T	Y	K		
K	S	G	R	N	K	A	L	K	K	F	K	E	V	L	T		
M	E	V	L	E	L	K	N	N	S	L	T	P	T	E	K	10	
N	L	H	F	I	W	I	G	G	Q	I	N	D	T	A	I		
N	Y	I	N	Q	W	K	D	V	N	S	D	Y	K	V	K		
V	F	Y	D	S	N	A	F	L	I	N	T	F	R	K	R		
I	V	E	S	A	T	N	N	T	L	E	S	R	Y	K	R		
L	N	D	P	E	F	D	Y	N	K	F	Y	I	Y	K	M		15
E	I	I	Y	D	K	Q	K	H	F	I	D	I	I	K	S		
Q	I	E	E	N	P	E	F	I	I	D	N	L	N	K	T		
Y	L	S	N	E	Y	S	K	D	L	E	A	G	N	D	Y		
I	E	E	S	L	N	K	I	T	A	N	N	R	L	I	I		20
R	N	L	E	K	F	A	D	E	D	L	V	S	D	V	N		
Q	E	L	V	E	R	W	N	L	A	A	A	L	D	I	L		
R	I	S	M	L	K	E	D	G	G	V	Y	I	N	K	P		
M	L	P	G	I	Q	P	D	L	F	K	S	L	E	A	I		25
D	S	I	T	N	Y	S	W	E	M	I	S	K	N	F	D		
M	K	Y	K	E	V	I	P	G	Y	T	S	A	L	S	S		
M	L	D	K	S	E	I	R	S	F	E	D	D	I	K	V		
K	S	P	L	V	K	I	F	L	P	L	N	S	V	I	N		30
Q	A	L	I	S	L	K	D	S	Y	C	S	D	L	N	I		
N	Q	I	K	N	R	Y	K	I	L	N	D	N	L	F	P		
S	I	N	E	G	T	D	F	N	T	T	M	K	I	M	S		
D	K	L	A	S	I	S	N	E	D	N	M	M	F	M	I		35
K	I	T	N	Y	L	K	V	G	F	A	P	D	V	R	S		
T	I	N	L	S	G	P	G	V	Y	T	G	A	Y	Q	E		
L	L	M	F	K	D	N	S	T	N	I	H	L	Q	E	P		
E	Q	R	I	E	S	F	P	K	T	K	I	S	R	L	T		
S	Q	F	E	E	Y	K	K	G	Y	F	E	G	A	L	K		40
E	D																

Darüber hinaus kann das biologisch aktive Fragment noch am N- und/oder C-Terminus weitere Sequenzen aufweisen. Bevorzugt ist jedoch, wenn das Fragment keine weiteren Sequenzen aufweist, die von Clostridium-DNA abgeleitet sind. 45

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Abwandlungen und Variationen des bevorzugt eingesetzten Fragments des lethalen Toxins. Die beanspruchten Fragmente weisen eine Homologie zu der in Seq.-ID-Nr. 1 angegebenen Aminosäuresequenz von wenigstens 80% auf. Eine Homologie von 80% bedeutet, daß jeweils 80% der Aminosäuren an der jeweiligen Position der angegebenen Sequenz entsprechen, wohingegen 20% der Aminosäuren unterschiedlich sein können. Die essentiellen Bereiche des Proteinfragments müssen dabei unverändert bleiben, jedoch ist es möglich, daß 50 Aminosäuren in den nicht biologisch aktiven Bereichen ausgetauscht werden können, wobei bevorzugt die Aminosäuren durch ähnliche Aminosäuren ausgetauscht werden. Die Ähnlichkeit wird bedingt durch die Seitenketten, insbesondere durch die Polarität und die Ladung der Seitenketten.

Die erfindungsgemäßen Fragmente können bevorzugterweise in Immuntoxinen Verwendung finden. In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung daher Immuntoxine, die erfindungsgemäß ein biologisch aktives Fragment 55 und eine Zellbindungskomponente aufweisen.

Die Zellbindungskomponente kann ein Antikörper oder ein Teil davon (variable Regionen) sein, der spezifisch an eine Zielzelle bindet. Alternativ hierzu kann die Zellbindungskomponente ein Ligand sein, der spezifisch an einen Rezeptor der Zielzelle binden kann.

Bei den Zielzellen handelt es sich bevorzugt um Tumorzellen. 60

Als weiteren Bereich können die erfindungsgemäßen Immuntoxine ein Transportsystem oder einen Translokationsbereich aufweisen, der es ermöglicht, daß das Toxin in das Zytosol der Zelle eingebracht wird. Erfindungsgemäß wird besonders das Transportsystem des Pseudomonas Exotoxin A oder des Diphtherietoxins bevorzugt eingesetzt. In einer anderen bevorzugt eingesetzten Ausführungsform wird das Transportsystem des C2-Toxin bevorzugt eingesetzt, das in der deutschen Patentanmeldung 197 35 105.0 näher beschrieben ist. Das C2-Transportsystem beinhaltet die N-terminale 65 C2J-Domäne des C2-Toxins von C.botulinum als Interaktionsdomäne.

Die vorliegende Erfindung betrifft also die Verwendung eines erfindungsgemäßen Fragments als Toxin, das zur Abtötung spezifischer Zellen eingesetzt werden kann.

Die erfindungsgemäßen Immunttoxine weisen also in bevorzugter Ausführungsform wenigstens drei Bereiche auf. Der erste Bereich ist der Zellbindungsbereich. Mit Hilfe des Zellbindungsbereiches dockt das Immuntotoxin an die Zielzelle an. Bei den natürlich vorkommenden Immuntoxinen bindet dieser Bereich üblicherweise an einen Rezeptor der Zielzelle. Beim *Pseudomonas* Exotoxin A bindet dieser Bereich beispielsweise an den  $\alpha 2$ -Makroglobulinrezeptor. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann es sich bei der Zellbindungskomponente um einen Antikörper oder ein Antikörperfragment handeln, das an eine bestimmte Struktur an der Zelloberfläche bindet. Es ist nicht erforderlich, daß der gesamte Antikörper beim Immuntotoxin vorhanden ist. Ausreichend können beispielsweise die Fv-Fragmente sein, die die variablen Regionen aus den Fab-Fragmenten eines Antikörpers darstellen.

Alternativ hierzu kann die Zellbindungskomponente ein Ligand sein, der an einen Rezeptor auf der Zelle bindet. Liganden können beispielsweise Zytokine wie Interferon, Interleukine, Tumornekrosefaktor usw. sein, die an die hierfür spezifischen Rezeptoren binden. Da üblicherweise eine möglichst hohe Zellspezifität für die Immunttoxine gewünscht wird, werden erfindungsgemäß bevorzugt solche Liganden eingesetzt, die an Rezeptoren binden, die sich nur oder zumindest überwiegend auf den Zielzellen finden.

Das erfindungsgemäße Fragment des lethalen Toxins kann besonders vorteilhaft bei Tumoren verwendet werden, da das Toxinfragment zelleigene Enzyme inaktiviert, die bei der Krebsbildung außer Kontrolle geraten sind. Die Ras-Gene gehören zu den Onkogenen und werden besonders stark in Tumorzellen exprimiert. Wenn also die aufgrund des Tumors übermäßig stark exprimierten Ras-Genprodukte wieder inaktiviert werden können, ermöglicht diese eine effektive Tumorthherapie.

Gegenüber dem unveränderten lethalen Toxin weisen die erfindungsgemäßen Fragmente den Vorteil auf, daß sie kleiner sind. Kleinere Proteine können aber von den Zielzellen leichter aufgenommen werden und die toxische Wirkung kann sich daher besser im Zytosol der Zielzelle entfalten.

Bei der Therapie mit Immuntoxinen hat sich die Bildung von Antikörpern gegen das Toxin als Problem herausgestellt. Da erfindungsgemäß nur ein Fragment des Holotoxins eingesetzt wird, ist die Gefahr der Bildung von (neutralisierenden) Antikörpern verringert.

Überraschenderweise wurde auch herausgefunden, daß die erfindungsgemäßen Toxinfragmente eine höhere Aktivität aufweisen als das unveränderte Holotoxin.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgend beschriebenen Beispiele näher erläutert.

#### Beispiel 1

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion wurden zwei Fragmente des lethalen Toxins von *C.sordellii*, Stamm 6018 amplifiziert. Einmal wurde das erfindungsgemäße Fragment mit den Aminosäuren 1 bis 546. Weiterhin wurde als Vergleich das Fragment mit den Aminosäuren 1 bis 517 durch Verkürzung des erstgenannten Fragments hergestellt.

Die Amplifikation der Fragmente wurde mit Hilfe des PCR-Systems 2400 von Perkin Elmer gemäß den Vorschriften des Herstellers durchgeführt, wobei das Primerpaar CS1C/CS1N eingesetzt wurde. Die Primer hatten folgende Sequenzen:

5' -AGATCTATGAACCTTAGTTAACAAAGCC-3'

Seq.-ID-Nr. 2

5' -GGATCCGAACCTTATCCTAAATCC-3'

Seq.-ID-Nr. 3

Die Reaktion wurde mit 300 nmol Primern, 250 ng chromosomaler DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl in 30 Zyklen durchgeführt (Denaturierung, 94°C, 10 Sek.; Annealing, 48°C, 30 Sek.; Verlängerung, 68°C, 3 Min.). Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen BglII/BamHI verdaut und in den Expressionsvektor pGEX2T kloniert.

Für die C-terminale Deletionsvariante 1-517 wurde zusätzlich mit den Restriktionsenzymen SpeI/EcoRI verdaut. Die verkürzten Fragmente wurden mit DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment aufgefüllt und religiert.

Nach Sequenzierung wurde die DNA-Sequenz des Fragmentes 1-546 bestimmt. Dabei wurde folgende DNA-Sequenz ermittelt:

ATG AAC TTA GTT AAC AAA GCC CAA TTA CAA AAA ATG GTA TAT GTA AAA  
 TTT CGT ATT CAA GAA GAT GAG TAC GTA GCA ATA TTA AAT GCT CTA GAA 5  
 GAA TAT CAC AAC ATG TCA GAA AGT AGT GTA GTT GAA AAG TAT TTA AAA  
 TTA AAG GAT ATA AAT AAT CTC ACA GAT AAT TAC CTG AAC ACA TAT AAA  
 AAA TCT GGA AGG AAT AAA GCC TTA AAA AAA TTT AAA GAA TAT CTA ACT  
 ATG GAA GTA TTA GAG CTA AAA AAT AAT AGT CTA ACT CCA GTC GAA AAA  
 AAT TTA CAT TTT ATA TGG ATT GGA GGA CAA ATA AAT GAT ACC GCT ATC 10  
 AAC TAT ATA AAT CAA TGG AAA GAT GTA AAT AGC GAT TAT ACA GTT AAA  
 GTT TTT TAT GAT AGT AAT GCA TTT TTG ATA AAT ACA TTA AAG AAA ACT  
 ATT GTT GAG TCA GCA ACA AAT AAT ACT CTT GAG TCA TTT AGA GAA AAC  
 TTA AAT GAC CCT GAA TTC GAT TAT AAT AAA TTT TAT AGA AAA CGT ATG 15  
 GAA ATA ATA TAT GAT AAA CAA AAA CAT TTT ATA GAT TAT TAT AAG TCT  
 CAG ATA GAA GAG AAT CCT GAA TTT ATA ATT GAT AAT ATT ATA AAA ACA  
 TAT CTC TCA AAT GAG TAT TCA AAA GAC CTA GAA GCC CTT AAT AAG TAT  
 ATT GAA GAA TCT TTA AAT AAA ATT ACT GCT AAT AAT GGT AAT GAT ATC 20  
 AGA AAT CTA GAA AAA TTT GCT GAT GAG GAT TTG GTA AGA TTA TAT AAT  
 CAA GAA TTA GTA GAA AGA TGG AAT TTG GCT GCT GCT TCT GAT ATA TTA  
 CGA ATA TCT ATG TTA AAA GAA GAT GGT GGT GTA TAT TTA GAT GTT GAC  
 ATG TTA CCA GGT ATA CAA CCA GAT TTA TTT AAA TCT ATA AAC AAG CCT 25  
 GAT TCG ATA ACA AAT ACA AGT TGG GAA ATG ATA AAG TTA GAG GCT ATA  
 ATG AAA TAT AAG GAA TAT ATA CCA GGG TAT ACG TCA AAG AAT TTT GAC  
 ATG TTA GAT GAA GAA GTT CAA CGC AGT TTT GAA TCT GCT TTA AGT TCT  
 AAA TCA GAT AAG TCA GAA ATT TTT TTG CCA CTT GAT GAT ATA AAA GTA  
 TCC CCG TTA GAA GTA AAA ATT GCA TTT GCC AAT AAC TCT GTT ATA AAT 30  
 CAA GCC TTA ATT TCT TTA AAA GAT TCC TAT TGT AGT GAT TTA GTA ATA  
 AAT CAA ATT AAA AAT AGA TAT AAA ATC TTG AAC GAC AAC TTA AAT CCA  
 TCC ATT AAT GAA GGT ACT GAC TTT AAT ACT ACA ATG AAA ATT TTT AGT  
 GAC AAA TTA GCA TCT ATT TCT AAT GAA GAT AAT ATG ATG TTT ATG ATA 35  
 AAA ATT ACA AAT TAT TTA AAA GTT GGA TTT GCT CCA GAT GTT AGA AGT  
 ACT ATT AAC TTA AGT GGA CCT GGA GTA TAT ACA AAT ATT CAT TTA CTA GAA CCT  
 TTG TTA ATG TTT AAA GAT AAT AGT ACA AAT ATT CAT TTA CTA GAA CCT  
 GAG TTA AGA AAT TTT GAG TTT CCT AAA ACT AAA ATT TCT CAA TTA ACA  
 GAA CAG GAA ATA ACT AGT TTA TGG TCA TTT AAC CAA GCA AGA GCC AAG 40  
 TCT CAA TTT GAA GAA TAT AAA AAA GGT TAT TTT GAA GGT GCA CTT GGA  
 GAA GAT

## Beispiel 2

Es wurde die Glucosyltransferase-Aktivität des Holoenzym verglichen mit der des erfindungsgemäßen Fragments (AS 1-546) und mit der des am C-Terminus deletierten Fragments mit den Aminosäuren 1-517.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Fig. 1 dargestellt. Hierzu wurde jeweils 1 µg Ras mit dem Holoenzym (schwarz ausgefülltes Dreieck [▲]), gereinigtem N-terminalen Toxinfragment mit den Aminosäuren 1-546, dargestellt als schwarz ausgefülltes Quadrat [■], und Deletionsfragment mit den Aminosäuren 1-517 (schwarz ausgefüllte Kreise [●]) inkubiert. Eingesetzt wurden jeweils 1 nM des Toxins. Die Inkubation erfolgte in Gegenwart von UDP-[<sup>14</sup>C]-Glucose (10 µM) für die angegebene Zeit. Dann wurden die markierten Proteine mit SDS PAGE und Phosphorbilddarstellung analysiert. Fig. 1 zeigt, daß das erfindungsgemäße Fragment eine höhere Aktivität aufweist als das Holotoxin. Die Aktivität ist bei dem weiterdeletierten Fragment (1-517) nahezu vollständig verlorengegangen.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

ANMELDER:

- (A) NAME: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- (B) STRASSE: Werthmannplatz
- (C) ORT: Freiburg
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 79098

ANMELDETITEL:

Toxikologisch aktive Fragmente des lethalen Toxins  
von Clostridium sordellii und deren Verwendung in  
Immuntoxinen

ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy Disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PADAT Sequenzmodul Version 1.0

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 546 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

5

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

15

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

20

Met Asn Leu Val Asn Lys Ala Gln Leu Gln Lys Met Val Tyr Val Lys  
 1 5 10 15

25

Phe Arg Ile Gln Glu Asp Glu Tyr Val Ala Ile Leu Asn Ala Leu Glu  
 20 25 30

30

Glu Tyr His Asn Met Ser Glu Ser Ser Val Val Glu Lys Tyr Leu Lys  
 35 40 45

Leu Lys Asp Ile Asn Asn Leu Thr Asp Asn Tyr Leu Asn Thr Tyr Lys  
 50 55 60

35

Lys Ser Gly Arg Asn Lys Ala Leu Lys Lys Phe Lys Glu Tyr Leu Thr  
 65 70 75 80

40

Met Glu Val Leu Glu Leu Lys Asn Asn Ser Leu Thr Pro Val Glu Lys  
 85 90 95

45

Asn Leu His Phe Ile Trp Ile Gly Gly Gln Ile Asn Asp Thr Ala Ile  
 100 105 110

50

Asn Tyr Ile Asn Gln Trp Lys Asp Val Asn Ser Asp Tyr Thr Val Lys  
 115 120 125

55

Val Phe Tyr Asp Ser Asn Ala Phe Leu Ile Asn Thr Leu Lys Lys Thr  
 130 135 140

60

65

## DE 198 02 569 A 1

5    Ile Val Glu Ser Ala Thr Asn Asn Thr Leu Glu Ser Phe Arg Glu Asn  
      145                      150                      155                      160

10    Leu Asn Asp Pro Glu Phe Asp Tyr Asn Lys Phe Tyr Arg Lys Arg Met  
      165                      170                      175

15    Glu Ile Ile Tyr Asp Lys Gln Lys His Phe Ile Asp Tyr Tyr Lys Ser  
      180                      185                      190

20    Gln Ile Glu Glu Asn Pro Glu Phe Ile Ile Asp Asn Ile Ile Lys Thr  
      195                      200                      205

25    Tyr Leu Ser Asn Glu Tyr Ser Lys Asp Leu Glu Ala Leu Asn Lys Tyr  
      210                      215                      220

30    Ile Glu Glu Ser Leu Asn Lys Ile Thr Ala Asn Asn Gly Asn Asp Ile  
      225                      230                      235                      240

35    Arg Asn Leu Glu Lys Phe Ala Asp Glu Asp Leu Val Arg Leu Tyr Asn  
      245                      250                      255

40    Gln Glu Leu Val Glu Arg Trp Asn Leu Ala Ala Ala Ser Asp Ile Leu  
      260                      265                      270

45    Arg Ile Ser Met Leu Lys Glu Asp Gly Gly Val Tyr Leu Asp Val Asp  
      275                      280                      285

50    Met Leu Pro Gly Ile Gln Pro Asp Leu Phe Lys Ser Ile Asn Lys Pro  
      290                      295                      300

55    Asp Ser Ile Thr Asn Thr Ser Trp Glu Met Ile Lys Leu Glu Ala Ile  
      305                      310                      315                      320

60    Met Lys Tyr Lys Glu Tyr Ile Pro Gly Tyr Thr Ser Lys Asn Phe Asp  
      325                      330                      335

65    Met Leu Asp Glu Glu Val Gln Arg Ser Phe Glu Ser Ala Leu Ser Ser  
      340                      345                      350

70    Lys Ser Asp Lys Ser Glu Ile Phe Leu Pro Leu Asp Asp Ile Lys Val  
      355                      360                      365

75    Ser Pro Leu Glu Val Lys Ile Ala Phe Ala Asn Asn Ser Val Ile Asn  
      370                      375                      380



# DE 198 02 569 A 1

Gln Ala Leu Ile Ser Leu Lys Asp Ser Tyr Cys Ser Asp Leu Val Ile  
385 390 395 400

5

Asn Gln Ile Lys Asn Arg Tyr Lys Ile Leu Asn Asp Asn Leu Asn Pro  
405 410 415

10

Ser Ile Asn Glu Gly Thr Asp Phe Asn Thr Thr Met Lys Ile Phe Ser  
420 425 430

15

Asp Lys Leu Ala Ser Ile Ser Asn Glu Asp Asn Met Met Phe Met Ile  
435 440 445

20

Lys Ile Thr Asn Tyr Leu Lys Asn Gly Phe Ala Pro Asp Val Arg Ser  
450 455 460

25

Thr Ile Asn Leu Ser Gly Pro Gly Val Tyr Thr Gly Ala Tyr Gln Asp  
465 470 475 480

30

Leu Leu Met Phe Lys Asp Asn Ser Thr Asn Ile His Leu Leu Glu Pro  
485 490 495

35

Glu Leu Arg Asn Phe Glu Phe Pro Lys Thr Lys Ile Ser Gln Leu Thr  
500 505 510

40

Glu Gln Glu Ile Arg Ser Leu Trp Ser Phe Asn Gln Ala Arg Ala Lys  
515 520 525

45

Ser Gln Phe Glu Glu Tyr Lys Lys Gly Tyr Phe Glu Gly Ala Leu Gly  
530 535 540

50

Glu Asp  
545

55

60

65

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

5 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

10 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

20 AGATCTATGA ACTTAGTTAA CAAAGCC

27

25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

30 (A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

35 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

45 GGATCCGAAC CTTATCCTAA ATCC

24

50

55

60

65

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1638 Basenpaare  
 (B) ART: Nukleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

5

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATGAACTTAG TTAACAAAGC CCAATTACAA AAAATGGTAT ATGTAAAATT TCGTATTCAA	60	20
GAAGATGAGT ACGTAGCAAT ATTAAATGCT CTAGAAGAAT ATCACAACAT GTCAGAAAGT	120	
AGTGTAGTTG AAAAGTATTT AAAATTAAAG GATATAAATA ATCTCACAGA TAATTACCTG	180	25
AACACATATA AAAAATCTGG AAGGAATAAA GCCTTAAAAA AATTTAAAGA ATATCTAACT	240	30
ATGGAAGTAT TAGAGCTAAA AAATAATAGT CTAAGTCCAG TCGAAAAAAA TTTACATTTT	300	
ATATGGATTG GAGGACAAAT AAATGATACC GCTATCAACT ATATAAATCA ATGGAAAGAT	360	35
GTAAATAGCG ATTATACAGT TAAAGTTTTT TATGATAGTA ATGCATTTTT GATAAATACA	420	
TTAAAGAAAA CTATTGTTGA GTCAGCAACA AATAATACTC TTGAGTCATT TAGAGAAAAC	480	40
TTAAATGACC CTGAATTCGA TTATAATAAA TTTTATAGAA AACGTATGGA AATAATATAT	540	
GATAAACAAA AACATTTTAT AGATTATTAT AAGTCTCAGA TAGAAGAGAA TCCTGAATTT	600	45
ATAATTGATA ATATTATAAA AACATATCTC TCAAATGAGT ATTCAAAAGA CCTAGAAGCC	660	50
CTTAATAAGT ATATTGAAGA ATCTTTAAAT AAAATTACTG CTAATAATGG TAATGATATC	720	
AGAAATCTAG AAAAATTTGC TGATGAGGAT TTGGTAAGAT TATATAATCA AGAATTAGTA	780	55
GAAAGATGGA ATTTGGCTGC TGCTTCTGAT ATATTACGAA TATCTATGTT AAAAGAAGAT	840	
		60
		65

	GGTGGTGTAT ATTTAGATGT TGACATGTGA CCAGGTATAC AACCAGATTT ATTTAAATCT	900
5	ATAAACAAGC CTGATTCGAT AACAAATACA AGTTGGGAAA TGATAAAGTT AGAGGCTATA	960
	ATGAAATATA AGGAATATAT ACCAGGGTAT ACGTCAAAGA ATTTTGACAT GTTAGATGAA	1020
10	GAAGTTCAAC GCAGTTTTGA ATCTGCTTTA AGTTCTAAAT CAGATAAGTC AGAAATTTTT	1080
	TTGCCACTTG ATGATATAAA AGTATCCCCG TTAGAAGTAA AAATTGCATT TGCCAATAAC	1140
15	TCTGTTATAA ATCAAGCCTT AATTCTTTA AAAGATTCCT ATTGTAGTGA TTTAGTAATA	1200
	AATCAAATTA AAAATAGATA TAAATCTTG AACGACAACT TAAATCCATC CATTAAATGAA	1260
20	GGTACTGACT TTAATACTAC AATGAAAATT TTTAGTGACA AATTAGCATC TATTTCTAAT	1320
	GAAGATAATA TGATGTTTAT GATAAAAATT ACAAATTATT TAAAAGTTGG ATTTGCTCCA	1380
25	GATGTTAGAA GTACTATTAA CTTAAGTGGA CCTGGAGTAT ATACAGGAGC TTATCAAGAT	1440
30	TTGTTAATGT TTAAAGATAA TAGTACAAAT ATTCATTTAC TAGAACCTGA GTTAAGAAAT	1500
	TTTGAGTTTC CTAAACTAA AATTTCTCAA TTAACAGAAC AGGAAATAAC TAGTTTATGG	1560
35	TCATTTAACC AAGCAAGAGC CAAGTCTCAA TTTGAAGAAT ATAAAAAAGG TTATTTTGAA	1620
40	GGTGCACTTG GAGAAGAT	1638

## Patentansprüche

- 45 1. Fragment des lethalen Toxins von Clostridium, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 oder eine hierzu homologe Sequenz aufweist, wobei die Homologie zu der Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 wenigstens 80% beträgt.
2. Fragment gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Homologie zu der Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 wenigstens 90% beträgt.
- 50 3. Fragment gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Homologie zu der Aminosäuresequenz gemäß Sequenz-ID-Nr. 1 wenigstens 95% beträgt.
4. Immuntoxin, dadurch gekennzeichnet, daß es
  - a) ein Fragment gemäß einem der Ansprüche 1-3 und
  - b) eine Zellbindungskomponente
- 55 aufweist.
5. Immuntoxin gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellbindungskomponente (b) ein Antikörper oder ein Teil davon ist, der spezifisch an eine Zielzelle bindet.
6. Immuntoxin gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellbindungskomponente (b) ein Ligand ist, der spezifisch an einen Rezeptor der Zielzelle binden kann.
- 60 7. Immuntoxin gemäß Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Zielzelle um eine Tumorzelle handelt.
8. Immuntoxin nach einem der Ansprüche 4-7, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin
  - c) ein Transportsystem
- 65 aufweist.
9. Immuntoxin nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Transportsystem die Translokationsdomäne des Pseudomonas Exotoxins A ist.
10. Immuntoxin nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Transportsystem die Translokationsdomäne des C2-Toxins von Clostridium ist.

11. Verwendung eines Fragments gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 als zielzellspezifisches Toxin.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

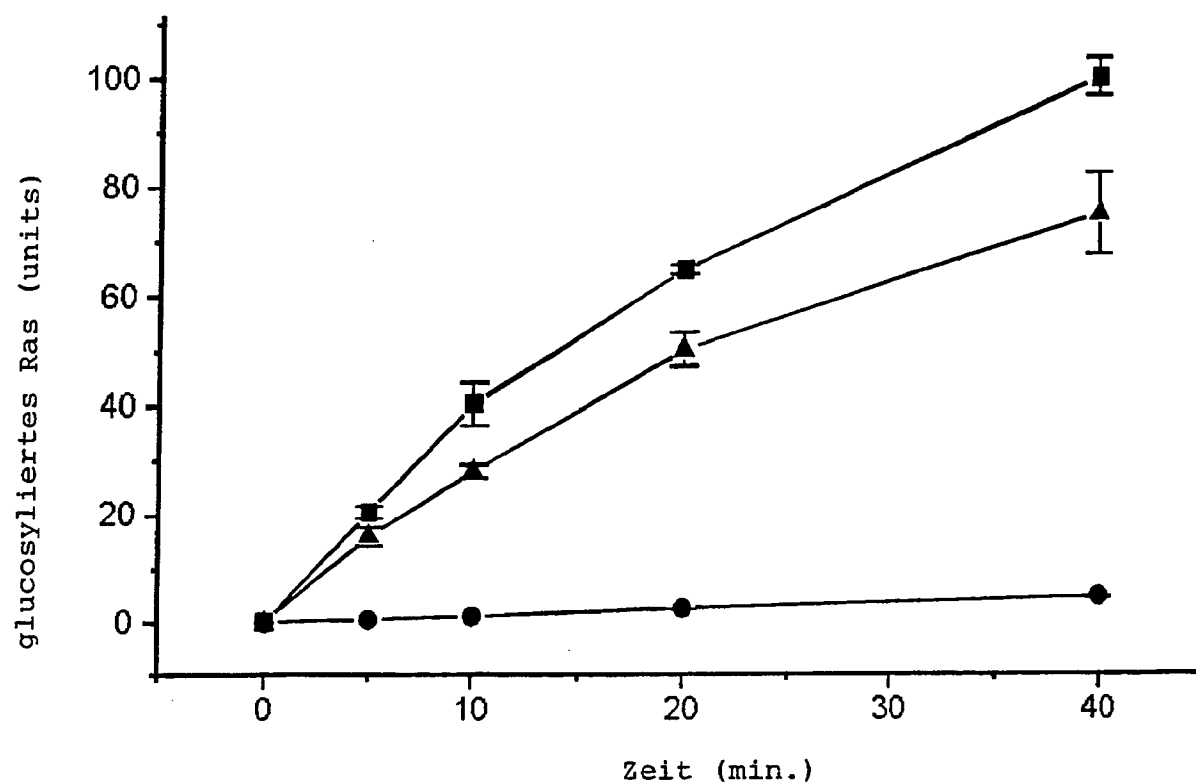


Fig. 1